

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA ROUTH PEIXOTO

**CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DO GENE *BCHE* E DA ATIVIDADE DA
BUTIRILCOLINESTERASE EM PESSOAS QUE APRESENTARAM APNEIA
PROLONGADA APÓS O USO DE SUCCINILCOLINA**

CURITIBA

2017

ANA PAULA ROUTH PEIXOTO

**CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES DO GENE *BCHE* E DA ATIVIDADE DA
BUTIRILCOLINESTERASE EM PESSOAS QUE APRESENTARAM APNEIA
PROLONGADA APÓS O USO DE SUCCINILCOLINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel no curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lupe Furtado Alle
Coorientador: Prof.^o Dr. Ricardo L. R. de Sousa

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me concedido a oportunidade de chegar até aqui, por toda força e bênçãos nesses anos, permitindo experiências e conhecimentos muito além do que eu imaginava.

Aos meus professores orientadores, Dr.^a Lupe Furtado Alle e Dr. Ricardo Lehtonen R. de Sousa, por todo aprendizado, paciência e disposição, sempre atenciosos, tentando ajudar.

À Carla, por me ajudar em tudo que eu pedi e precisei, sempre com muita disposição, boa vontade e carinho.

A todos os demais integrantes do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, pela disposição em ajudar sempre que necessário e pela agradável convivência.

Aos meus pais, Ricardo e Ilma, minha eterna gratidão pela educação que me deram ao longo da vida, por toda confiança, incentivo, amor e apoio incondicional em todas as minhas escolhas.

A meu irmão Guilherme e amigos, que estiveram sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando.

RESUMO

Pessoas tratadas com as mais diversas drogas apresentam variabilidade de resposta e de susceptibilidade aos medicamentos. Variações nessa resposta podem ser decorrentes de vários fatores tais como doenças e fatores genéticos, os quais geralmente estão associados com polimorfismos que podem alterar a expressão e/ou a atividade de enzimas relacionados com o metabolismo destes fármacos. A exemplo disso, o gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) apresenta polimorfismos que alteram a atividade da enzima butirilcolinesterase (BChE), uma esterase sérica, responsável pela hidrólise de substâncias contendo ésteres de colina, como certos bloqueadores neuromusculares como a succinilcolina. Sua atividade enzimática está reduzida na presença de algumas variantes como a atípica (A, rs1799807), a K (rs1803274) e a -116A (rs1126680). Estas alterações genéticas podem ser responsáveis por um quadro de relaxamento muscular prolongado após utilização de succinilcolina, uma vez que a baixa atividade da enzima dificulta a metabolização deste fármaco. O presente estudo visa analisar a presença das três variantes citadas e a atividade enzimática da BChE, em amostras de 20 pacientes provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil que passaram por episódios de apneia prolongada após o uso de succinilcolina durante uma cirurgia. O DNA foi extraído do sangue periférico através da técnica de *salting out* e as variantes foram genotipadas pela técnica de discriminação alélica *Taqman*. A atividade enzimática foi medida no plasma sanguíneo segundo uma técnica colorimétrica, baseada na hidrólise da propioniltiocolina. A frequência encontrada dos genótipos para a variante A foi de 45% UU (homozigotos usuais, que não apresentam a variante) 15% UA (heterozigotos, apresentam um alelo usual e um alelo da variante) e 40% AA (homozigotos para a variante). Para a variante K foi de 35% UU, 35% UK e 30% KK. Já para a variante -116A foi de 95% UU e 5% U-116A, não sendo encontrados indivíduos homozigotos para esta variante. Alguns indivíduos não apresentaram nenhuma das três variantes. A atividade da BChE encontra-se muito baixa, menor que 1U/mL, em todos os participantes. A presença de alguma variante associada à baixa atividade enzimática pode explicar os episódios de relaxamento muscular prolongado. Aqueles que não possuem nenhuma das três variantes devem passar por outros estudos para verificar se a situação vivenciada é causada por alguma outra alteração genética ou algum outro fator ambiental que possa interferir na atividade da enzima BChE.

ABSTRACT

People treated with the most diverse drugs present variability of response and susceptibility to medications. Variations in this response may be due to several factors such as diseases and genetic factors, which are usually associated with polymorphisms that may alter the expression and / or the activity of enzymes related to the metabolism of these drugs. As an example, the *BCHE* gene (3q26.1-q26.2) has polymorphisms that alter the activity of the enzyme butyrylcholinesterase (BChE), a serum esterase responsible for the hydrolysis of substances containing choline esters, such as certain neuromuscular blockers such as succinylcholine. Its enzymatic activity is reduced in the presence of some variants such as atypical (A, rs1799807), K (rs1803274) and -116A (rs1126680). These genetic alterations may be responsible for a prolonged muscle relaxation after the use of succinylcholine, since the low activity of the enzyme makes it difficult to metabolize this drug. The present study aims to analyze the presence of the three variants mentioned and the enzymatic activity of BChE in samples from twenty patients from southern and southeastern Brazil who experienced prolonged apnea after using succinylcholine during surgery. DNA was extracted from the peripheral blood by the salting out technique and the variants were genotyped by the *Taqman* allelic discrimination technique. The enzymatic activity was measured in the blood plasma according to a colorimetric technique, based on the hydrolysis of propionylthiocholine. The frequency of genotypes for variant A was 45% UU (usual homozygotes, which do not present the variant), 15% UA (heterozygotes, which present one usual allele and one variant allele) and 40% AA (homozygotes for the variant). For variant K it was 35% UU, 35% UK and 30% KK. Already for the -116A variant was 95% UU and 5% U-116A, no homozygous individuals were found for this variant. Some individuals did not present any of the three variants. BChE activity is very low, less than 1U / mL, in all participants. The presence of some variant associated to low enzyme activity may explain the episodes of prolonged muscle relaxation. Those who do not have any of the three variants should undergo further studies to verify if the situation experienced is caused by some other genetic change or some other environmental factor that may interfere with the activity of the BChE enzyme.

LISTA DE SIGLAS

AChE – Acetilcolinesterase

Ala – Aminoácido Alanina

Asp – Aminoácido Aspartato

BChE – Butirilcolinesterase

BCHE – Gene da butirilcolinesterase

BNM – Bloqueadores Neuromusculares

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTNB – Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

Glu – Aminoácido Glutamato

His – Aminoácido Histidina

IGEPAL – Octylphenoxypolyethoxyethanol

IMC – Índice de Massa Corporal

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

nt – Nucleotídeo

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAS - Sítio Aniônico Periférico

RNA – Ácido ribonucleico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Ser – Aminoácido Serina

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

TBE – Tris-ácido bórico-EDTA

TE – Tris-EDTA

Trp – Aminoácido Triptofano

Tyr – Aminoácido Tirosina

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVOS	8
1.1.1 OBJETIVO GERAL	8
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.2 JUSTIFICATIVA	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 FARMACOGENÉTICA	10
2.2 RELAXANTES MUSCULARES	11
2.3 BUTIRILCOLINESTERASE	13
2.4 GENE <i>BCHE</i>	16
2.4.1 VARIANTES DO GENE <i>BCHE</i>	17
3. METODOLOGIA	22
3.1 PARTICIPANTES	22
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	22
3.3 QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO	23
3.4 DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA	23
3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	24
3.6 ANÁLISE DE DADOS	25
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICE	36

1. INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase humana (BChE) é uma esterase sérica sintetizada pelo fígado e amplamente distribuída pelo organismo. É responsável pela hidrólise de substâncias contendo ésteres de colina, como certos bloqueadores neuromusculares de ação curta, como a succinilcolina (LOCKRIDGE, 2015).

É uma enzima polimórfica codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) (ARPAGAUS *et al.*, 1990) que apresenta cerca de 70 variantes descritas. A maioria dessas variantes tem um efeito sobre a atividade da BChE (JOHNSON; MOORE, 2012). A mais conhecida pela diminuição dessa atividade é a variante atípica (A), rs1799807, a qual é causada por uma substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 209 no exon 2, o que leva a uma diminuição da afinidade da enzima por ésteres de colina. Pessoas que possuem a variante apresentam uma atividade muito baixa da BChE, não sendo capazes de metabolizar corretamente e na mesma velocidade substâncias que contêm ésteres de colina, o que pode causar efeitos indesejados, como uma resposta prolongada de relaxamento muscular após administração endovenosa de succinilcolina (MCGUIRE *et al.*, 1989).

Outras variantes, como a K (rs1803274) e a -116A (rs1126680), também são conhecidas por ocasionar diminuição da atividade enzimática da BChE. Indivíduos que possuem essas variantes apresentam dificuldade de hidrolisar certas substâncias e podem sofrer desses efeitos também (BARTELS *et al.*, 1990).

A succinilcolina é um relaxante muscular utilizado para facilitar as intubações traqueais em procedimentos cirúrgicos. Devido à sua ação de curta duração, é frequentemente usado em cirurgias em que o bloqueio neuromuscular intenso é necessário por um curto período de tempo. A presença de uma ou mais variantes do gene *BCHE* pode causar um bloqueio neuromuscular que pode durar horas influenciando significativamente o trabalho na sala de operação e na sala de recuperação (KALOW, 1962; JOHNSON; MOORE, 2012).

Considerando a relevância de estudos envolvendo o efeito das variantes do gene *BCHE* sobre a atividade da butirilcolinesterase, o presente estudo tem por finalidade a identificação das variantes do gene *BCHE* em indivíduos que vivenciaram episódios de apneia prolongada após o uso de succinilcolina.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

- Descrever algumas variantes do gene *BCHE* e o nível de atividade enzimática em pacientes que apresentaram apneia prolongada após a utilização de succinilcolina.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade enzimática da BChE no plasma dos indivíduos que apresentaram apneia prolongada para verificar se há diferença entre os portadores das variantes do gene *BCHE*;
- Obter os genótipos dos pacientes para as variantes A, K e -116A de maneira a sugerir uma explicação para a apneia prolongada após o uso de succinilcolina;
- Descrever a relação entre as variantes do gene *BCHE* e a atividade enzimática de cada indivíduo.

1.2 JUSTIFICATIVA

Em operações em caráter de emergência o paciente deve ser submetido à respiração artificial. Para isso, é necessário que seja realizada uma intubação endotraqueal e para introduzir o tubo, o paciente, após estar anestesiado, precisa ter um relaxamento total das cordas vocais. Isto é obtido através da injeção venosa de relaxantes musculares, denominados de bloqueadores neuromusculares (BNM). Dentre estes, o mais utilizado é a succinilcolina, devido à sua ação ultrarrápida (GOLDBERG, 1989; BARAKA, 2011).

Existem muitas variações nas respostas de cada indivíduo a um mesmo medicamento. Quanto à succinilcolina, são descritas diferenças em relação ao tempo de efeito da droga. Em pacientes que exibem um efeito muito prolongado da droga este fenômeno pode ser explicado por doenças, principalmente no fígado, ou pela variação no gene que codifica a enzima BChE. Neste último caso, os indivíduos são considerados portadores de uma forma variante da enzima, mais frequentemente das variantes K e A, as quais ocasionam uma diminuição da atividade enzimática (WHITTAKER, 1980; FURTADO-ALLE, 2008).

Nessas circunstâncias, a identificação dos fatores moleculares associados a esse efeito prolongado da succinilcolina é de grande importância, já que pacientes com esse tipo de resposta necessitam de um tratamento diferenciado, uma vez que se o monitoramento neuromuscular não for aplicado na prática clínica diária, o risco de bloqueio neuromuscular residual aumenta. Além disso, essa informação possibilita o tratamento individualizado podendo reduzir o estresse físico e emocional, característico de qualquer procedimento cirúrgico, do paciente, bem como dos familiares, começando pelos cuidados da equipe médica, que por sua vez, pode optar pela utilização de outro relaxante muscular para compor o bolus anestésico do paciente, evitando resultados indesejados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FARMACOGENÉTICA

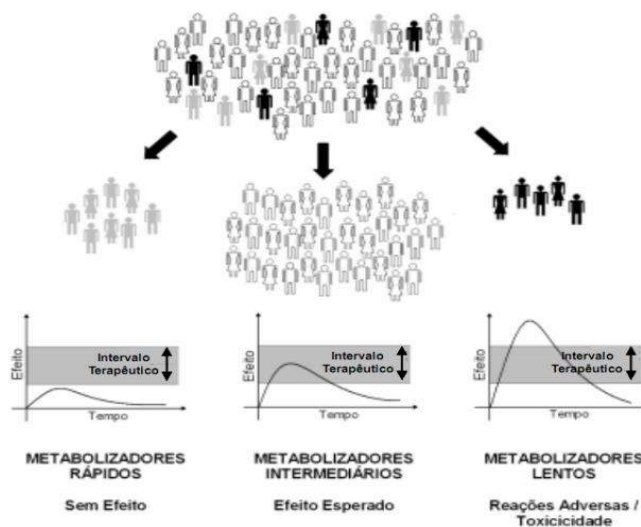
A farmacogenética pode ser considerada a ciência que examina as bases genéticas das variabilidades individuais, observadas nas respostas terapêuticas a tratamentos farmacológicos (SHI; BLEAVINS; LA IGLESIA, 2001). Em uma revisão sobre o tema, a farmacogenética foi definida como o estudo do papel da hereditariedade na variação individual ao efeito de um fármaco (WEINSHILBOUM; WANG, 2004).

Sabe-se que pacientes tratados com as mais diversas drogas apresentam variabilidade de resposta e de susceptibilidade a toxicidade aos medicamentos. Variações nessa resposta podem ser decorrentes de vários fatores tais como doenças, diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos, fatores ambientais e fatores genéticos (SHASTRY, 2006).

Esses fatores genéticos relacionados às respostas terapêuticas entre os indivíduos geralmente estão associados com polimorfismos genéticos, como por exemplo, as variações na sequência de nucleotídeos, em inglês: Single Nucleotide Polymorphisms – SNP, presentes em genes que afetam a farmacocinética ou a farmacodinâmica dos medicamentos. Tais polimorfismos podem alterar a expressão e/ou a atividade de sítios de ligação de fármacos, por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro correspondente ou modificarem a estrutura conformacional da proteína correspondente. Como consequência, essas alterações podem levar à redução ou ao aumento da atividade da proteína codificada afetando a resposta ao medicamento (GUTTMACHER; COLLINS; WEINSHILBOUM, 2003; THORISSON; STEIN, 2003).

Pacientes ao tomarem uma dose padronizada de determinado medicamento podem reagir de três maneiras: não responder, responder apenas parcialmente ou apresentar reações adversas ao medicamento, como ilustrado na FIGURA 1.

FIGURA 1. EXEMPLO ESQUEMÁTICO DAS POSSÍVEIS ALTERAÇÕES DE PERFIL METABÓLICO DE INDIVÍDUOS COM DIFERENTES CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS EM ENZIMAS METABOLIZADORAS.



FONTE: METZGER (2006)

Os metabolizadores lentos, em geral, são indivíduos com diminuição ou ausência da enzima metabolizadora, o que gera um efeito prolongado do medicamento. Os metabolizadores intermediários são os que apresentam metabolismo “normal”, comum a maioria da população. Já o fenótipo de metabolizadores rápidos pode ser decorrente de um aumento na produção da enzima metabolizadora associado a um aumento da expressão do gene que codifica a enzima, o que leva à diminuição ou ausência do efeito do medicamento (METZGER, 2006).

A título de exemplo, o gene *BCHE* possui alguns polimorfismos, objetos deste estudo, os quais alteram a atividade da enzima codificada, butirilcolinesterase, o que afeta a resposta do indivíduo a certos medicamentos, principalmente bloqueadores neuromusculares, como a succinilcolina. Esses indivíduos podem ser considerados metabolizadores lentos, uma vez que apresentam uma diminuição da atividade ou da própria enzima circulante, frente a ingestão de uma dose padrão do relaxante muscular.

2.2 RELAXANTES MUSCULARES E A BCHE

A succinilcolina é um relaxante muscular, amplamente utilizado para facilitar as intubações traqueais em pacientes de emergência e em pacientes com alto risco de regurgitação gastroesofágica. É hidrolisada pela butirilcolinesterase para formar succinilmonocolina e

depois, ácido succínico e colina. Quando a succinilcolina é injetada por via intravenosa cerca de 90% da dose normal é hidrolisada pela colinesterase dentro de 1 min e cerca de 10% da droga é excretada na forma inalterada. Assim, a dose real de succinilcolina que atinge a junção neuromuscular é menor do que a dose injetada (KALOW, 1962).

Ela compete com a acetilcolina pelos receptores colinérgicos da placa motora terminal, e se liga a esses receptores para produzir a despolarização. Entretanto, devido à sua alta afinidade pelos receptores colinérgicos e sua resistência à acetilcolinesterase, ela produz uma despolarização mais prolongada do que a acetilcolina. Isto faz com que o paciente experimente paralisia muscular completa (KALOW, 1962; MCCGUIRE, 1989).

Indivíduos que apresentam alguma variante no gene *BCHE* possuem maior sensibilidade aos relaxantes musculares. Em pessoas com níveis usuais da enzima BChE, estes fármacos são rapidamente hidrolisados no plasma e a sua duração é de ação curta, menos de 10 min. A deficiência na enzima resulta em hidrólise mais lenta destes fármacos e, consequentemente, um bloqueio neuromuscular prolongado, levando à apneia (JOHNSON; MOORE, 2012).

A recuperação do paciente sob efeito de succinilcolina não começa até que a maior parte da succinilcolina tenha sido hidrolisada ou eliminada do sangue e do fluido extracelular. Durante o período de paralisia completa, uma quantidade significativa de succinilcolina está presente no sangue e no fluido extracelular (GATKE, 2001). Depois dela ter sido eliminada do sangue e do fluido extracelular, a taxa de recuperação da apneia depende da concentração de succinilcolina remanescente nas terminações nervosas, isto é, do número de receptores ocupados (ØSTERGAARD *et al.*, 1988).

Em análises feitas *in vitro* onde a concentração de succinilcolina pode ser aumentada até níveis de saturação, observou-se que a BChE em indivíduos que apresentam a variante atípica, hidrolisa a succinilcolina com a mesma velocidade máxima que a BChE em indivíduos normais, sem variantes. Assim, a consequência da baixa afinidade da BChE em portadores da variante A pela succinilcolina é devido ao fato que nenhum dos fármacos administrados é hidrolisado no sangue. Por conseguinte, as terminações nervosas recebem uma sobredosagem de 50-100 vezes de succinilcolina (KALOW, 1962).

Em estudo realizado por Kalow e colaboradores (1957) após uma dose de 100 mg de succinilcolina o tempo de duração da apneia de acordo com o genótipo para a variante A é de 3-6 min em pessoas homozigóticas para BChE usual, 5-12 min em pessoas heterozigóticas e

50-65 min em pessoas homozigóticas para BChE atípica. Assim, a succinilcolina pode ser dada a pessoas que possuem a variante atípica, mas a dose deve ser reduzida para 1% da dose normal para alcançar 5 min de apneia.

Pacientes homozigotos para a variante A são muito sensíveis também ao mivacúrio. Em um estudo realizado por Gatke et al. (2005) foi observado que depois da administração da dose usual de 0.12-0.2 mg/kg de mivacurio, o tempo para recuperação espontânea total da função neuromuscular em pacientes homozigotos para variante A é de 6 a 8h, enquanto que em pacientes normais esse tempo é de aproximadamente 30 min (GÄTKE *et al.*, 2017).

O tratamento da apneia prolongada consiste em ventilação contínua e sedação até que a resposta adequada à estimulação nervosa periférica seja recuperada (DAVIS, 1997).

2.3 BUTIRILCOLINESTERASE

Existem dois tipos de colinesterases (esterases que hidrolisam ésteres de colina) nos vertebrados. A acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7, segundo a Comissão de Enzimas), que atua preferencialmente na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, produzindo acetato e colina, e é encontrada na membrana dos eritrócitos, no plasma, sistema nervoso central e junções neuromusculares (JOHNSON; MOORE, 2000; VIJAYARAGHAVAN et al., 2013). E a butirilcolinesterase, também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase não-específica (BChE; EC 3.1.1.8), que tem como substrato preferencial a butirilcolina e que está envolvida em diversos processos como a hidrólise de substâncias contendo ésteres de colina, como certos bloqueadores neuromusculares de ação curta, amplamente utilizados durante a anestesia geral, como a succinilcolina, bem como pela metabolização de drogas como a aspirina e a cocaína (LOCKRIDGE, 1990; 2015).

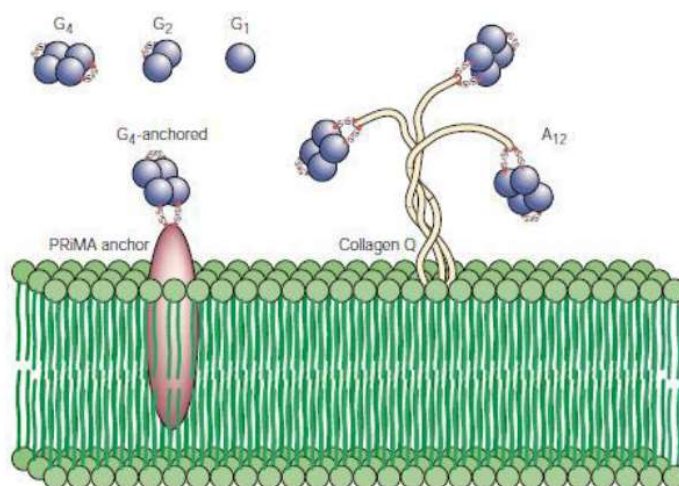
Evidências sugerem que a butirilcolinesterase pode atuar como um co-regulador da atividade da acetilcolina no sistema nervoso central, uma vez que a inibição dessa enzima aumenta de maneira dose dependente os níveis desse neurotransmissor no cérebro (GIACOBINI, 2000). Na ausência da acetilcolinesterase, a BChE parece substituí-la na manutenção da integridade estrutural e fisiológica do sistema colinérgico (MESULAM *et al.*, 2001).

A butirilcolinesterase humana é amplamente distribuída por todo o corpo, com níveis mais altos detectados no plasma e no fígado (DELACOUR et al., 2014; JOHNSON; MOORE, 2012). Sua forma mais comum consiste em um tetrâmero com quatro subunidades idênticas, sendo cada monômero formado por uma cadeia de 574 aminoácidos, nove cadeias laterais de oligossacarídeos ligados a nove asparaginas e um peso molecular de aproximadamente 85 kDa (LOCKRIDGE et al., 1987).

É possível identificar cinco formas moleculares principais da BChE existentes no organismo humano: monômero (C1), dímero (C3), tetrâmero (C4), monômero ligado à albumina sérica (C2) e tetrâmero ligado a uma substância desconhecida (C5) (LOCKRIDGE; ECKERSON; LA DU, 1979).

Uma outra nomenclatura da BChE, baseada na estrutura molecular e não na mobilidade eletroforética, pode ser utilizada. É fundamentada no número de subunidades moleculares e no fato delas serem globulares. A forma C1 corresponde à forma globular monomérica, denominada G1, o dímero C3 é denominado G2 e o tetrâmero C4 de G4, como demonstrado na FIGURA 2. Um trímero de mobilidade intermediária entre C3 e C4, formado a partir de C4 submetido à tripsina, é designado de G3. O monômero ligado à albumina (C2) é referido como G1-ALB (MASSON, 1989).

FIGURA 2. FORMAS MOLECULARES DA BCHE E POSSÍVEIS VARIAÇÕES



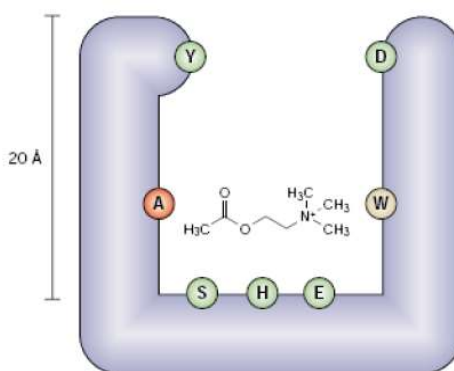
FONTE: DARVESH *et al.* (2003).

LEGENDA: G1: forma globular solúvel monomérica; G2: forma gobular solúvel dimérica; G4: forma globular solúvel tetramérica. A forma G4-ancorada é um tetrâmero ligado a membrana através da interação com PRiMA (âncora rica em prolina). A12 é uma forma assimétrica em que três tetrâmeros estão ligados à membrana por uma tripla hélice de colágeno Q.

No plasma, a totalidade da BChE e cerca de 1 % da AChE consistem de subunidades catalíticas globulares, sendo 95% da BChE encontrada na forma de tetrâmeros (BLONG; BEDOWS; LOCKRIDGE, 1997) que são estáveis na circulação com um tempo de meia-vida de 7 a 12 dias (SUN, 2002). Os tetrâmeros, com peso molecular de aproximadamente 340 kDa, são formados por dímeros, onde cada dímero é constituído por monômeros ligados por uma ponte dissulfeto, e os dímeros que se arranjam na formação do tetrâmetro são unidos por ligações não covalentes (LOCKRIDGE *et al.*, 1987).

Quanto à estrutura, a BChE apresenta uma folha β central rodeada por α -hélices (MILLARD; BROOMFIELD, 1992). O centro ativo da BChE é constituído por 1 sítio esterásico e 1 sítio aniônico, com tamanho de 20Å. O sítio esterásico é formado pela tríade catalítica dos aminoácidos Ser198 (S), His438 (H) e Glu325 (E), responsáveis pela hidrólise (SHAFFERMAN *et al.*, 1992). O sítio aniônico periférico (PAS) é formado pelos aminoácidos Asp70 (D) e Tyr332 (Y), o qual está relacionado com a ligação inicial de substratos carregados positivamente (FIGURA 2). Há também um sub-sítio aniônico de ligação formado por W e um sítio de acilação, A, no qual o grupo acil dos ésteres de colina encaixa-se durante a catálise (FIGURA 3) (LOCKGRIDGE *et al.*, 1987; MASSON *et al.*, 2001).

FIGURA 3. ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO CENTRO ATIVO DO MONÔMERO DA BUTIRILCOLINESTERASE



FONTE: DARVESH *ET AL.* (2003).

LEGENDA: O grupo acilo do substrato (acetilcolina mostrada aqui) se liga à alanina (A), enquanto o nitrogênio quaternário interage com o sítio aniônico que consiste no aminoácido triptofano (W). Os substratos são guiados pelo site ativo por interação com ácido aspártico (D) e tirosina (Y). A: Ala328; D: Asp70; E: Glu325; H: His438; S: Ser198; W: Trp82; Y: Tyr332.

Além disso a BChE está relacionada ao metabolismo lipídico e tem sido associada ao IMC, à circunferência da cintura, peso, colesterol e triglicerídeo leve (CHAVES et al., 2013). Assim, alterações na atividade da BChE podem ser associadas a doenças como obesidade, resistência à insulina, síndrome metabólica, hiperlipidemia, doença arterial coronariana, hipertensão arterial e doença de Alzheimer (LI; DUYSSEN; LOCKRIDGE, 2008; LIMA et al., 2013).

Diversos fatores e patologias podem influenciar a atividade da BChE, como destacado no QUADRO 1. Além dessas relações, Whittaker (1980) mostrou em seu estudo que em adultos a atividade da BChE é mais elevada em homens do que em mulheres devido a uma aparente modulação hormonal negativa desencadeada pelo estrógeno (WHITTAKER, 1980).

QUADRO 1. ALGUNS FATORES ASSOCIADOS A ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE DA BCHE

Aumento da atividade	Redução da atividade
Fenótipo CHE2 C5+	Variantes do gene <i>BCHE</i>
Obesidade	Doenças hepáticas
Diabetes Mellitus Tipos I e II	Infarto do miocárdio
Psoríase	Infecção aguda
Esquizofrenia	Má nutrição
Hipertensão	Pílula contraceptiva
Alcoolismo	Organofosforados

FONTE: WHITTAKER (1980).

2.4 O GENE *BCHE*

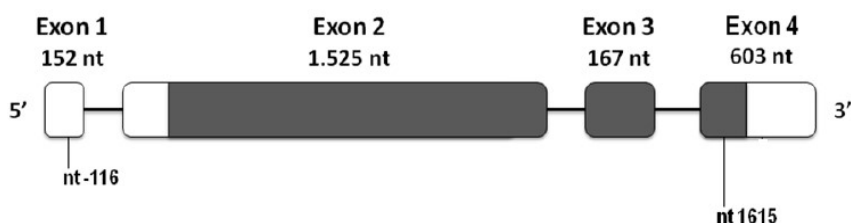
O gene *BCHE* está localizado no braço longo do cromossomo 3 (q26.1-q26.2). Consiste em aproximadamente 64 kb abrangendo 4 exons, sendo o exon 1 não traduzido na proteína madura, assim como a parte inicial do exon 2 e a parte final do exon 4, e 3 introns (ALLDERDICE *et al.*, 1991) (FIGURA 4).

O exon 1 (152 pb) além de formar a sequência 5'UTR não traduzida no RNAm apresenta dois sítios potenciais de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2 (1.525 pb) apresenta o primeiro nucleotídeo que codifica para o peptídeo maduro e contém 83% da sequência

codificadora da proteína BChE, incluindo a extremidade N-terminal, o sítio ativo e um terceiro possível sítio de início de tradução no códon -28. O exon 3 tem 167 nucleotídeos e o exon 4 (603 pb) codifica a extremidade C-terminal da proteína e a região 3'UTR não traduzida que contém dois sinais de poliadenilação (ARPAGAUS *et al.*, 1990).

O intron 1-2 tem 6.276 nucleotídeos, o intron 2-3 tem 43.205 nucleotídeos e o intron 3-4 possui 12.638 nucleotídeos. A sequência codificadora possui 1.809 nucleotídeos traduzidos em 602 aminoácidos, sendo 84 nucleotídeos codificantes para uma sequência peptídica sinalizadora composta por 28 aminoácidos e 1.722 nucleotídeos codificadores dos 574 aminoácidos correspondentes a cadeia polipeptídica da BChE (NCBI, acessado em 10/04/2017).

FIGURA 4. DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE *BCHE*



FONTE: Adaptado de PARNAS *et al.* (2011).

LEGENDA: O desenho mostra os quatro exons, o número de pares de bases que os compõem e os sítios -116 e 1615 de duas variantes analisadas no presente estudo.

NOTA: A região sombreada em cinza corresponde à região codificadora da proteína madura.

Não há formas conhecidas de *splicing* alternativo para a BChE humana. A forma solúvel, globular tetramérica no plasma bem como as formas ligadas à membrana, no músculo e no cérebro, são codificadas pelo mesmo mRNA (DELACOUR *et al.*, 2014; MASSOULIÉ, 2002).

2.4.1 VARIANTES DO GENE *BCHE*

A existência de variabilidade no gene *BCHE* foi pela primeira vez constatada na década de 50, em pacientes que sofriam de apneia e paralisia muscular prolongada quando submetidos a doses farmacológicas de succinilcolina (KALOW; GENEST, 1957).

Cerca de 70 variantes do gene *BCHE* já foram descritas (MIKAMI, 2005; SOUZA et al., 2005) e estão representadas na TABELA 1. Muitas destas estão envolvidas no desenvolvimento de patologias.

TABELA 1. LISTA DE VARIANTES JÁ DESCRITAS DO GENE *BCHE*, INCLUINDO LOCALIZAÇÃO, ALTERAÇÃO NA SEQUÊNCIA E NOME DO POLIMORFISMO

NUCLEOTÍDEO	ALTERAÇÃO	POLIMORFISMO	NUCLEOTÍDEO	ALTERAÇÃO	POLIMORFISMO
EXON 1			Cont. EXON 2		
nt -116	G->A	-116	nt 748	ACT->CCT	T250P
EXON 2			nt 765	GAG->GAC	E255D
nt 9-11	CATCAT->CAT	I4del	nt 800	AAA->AGA	K267R
nt 16	ATT-> TT	I6fs	nt 811	GAA->TAA	E271X
nt 35	AAA->AGA	K12R	nt 880	GTG->ATG	V294M
nt 45	GGG->GGC	G15G	nt 920	CTT->CCT	L307P
nt 71	ACG->ATG	T24M	nt 943	ACC->AACC	T315fs
nt 82	TTT->ATT	F28I	nt 943	ACC->TCC	T315S
nt 98	TAT->TGT	Y33C	nt 988	TTA->ATA	L330I
nt109	CCT->TCT	P37S	nt 997	GGT->TGT	G333C
nt 208	GAT->CAT	D70H	nt 1020-1021	GAT->GATA	D340insA
nt 209	GAT->GGT	D70G	nt 1093	GGA->CGA	G365R
nt 223	G->C	G75R	nt 1156	CGT->TGT	R386C
nt 270	A->C	E90D	nt 1169	GGT->GTT	G390V
nt 286	AAT ->TAT	N96Y	nt 1200	TGC->TGA	C400X
nt 297	T->G	I99M	nt 1253	TTC->TCC	F418S
nt 298	CCA->TCA	P100S	nt 1270	CGA->TGA	R424X
nt 318	AAT->AAAT	N106FS	nt 1273	TCC->CCC	S425P
nt 344	GGT->GAT	G115D	nt 1303	GGA->AGA	G435R
nt 351	GGT->GGAG	G117fs	nt 1336	TTT->GTT	F446V
nt 355	CAA->TAA	Q119X	nt 1351	GAA->TAA	E451X
nt 375	TTA->TTT	L125F	nt 1378	GAG->AAG	E460K
nt 383	TAT->TGT	Y128C	nt 1393	AGA->TGA	R465X
nt 395	GCT->GCTA	A134fs	nt 1408	CGG->TGG	R470W
nt 424	GTG->ATG	V142M	nt 1410	CGT->CGG	
nt 486	GCT->GCC	A162A	nt 1411	TGG->CGG	W471R
nt 510	GAT->GAG	D170E	EXON 3		
nt 514	CAG->TAG	Q172X	nt 1490	GAA->GTA	E497V
nt 551	GCC->GTC	A184V	nt 1500	TAT ->TAA	Y500X
nt 592	AGT->GGT	S198G	nt 1543	CGT->TGT	R515C
nt 596	GCA->GTA	A199V	nt 1553	CAA->CTA	Q518L
nt 601	GCA->ACA	A201T	EXON 4		
nt 607	TCA->CCA	S203P	nt 1615	GCA->ACA	A539T
nt 728	ACG->ATG	T243M	nt 1914	A->G	Região não codificadora

FONTE: Adaptado de MIKAMI (2005).

A maioria das mutações envolvendo o gene *BCHE* tem um efeito sobre a atividade da enzima BChE. Isso pode ocorrer por efeitos deletérios de mutações pontuais no funcionamento

catalítico ou por mutações pontuais que afetam a expressão proteica, o que pode resultar na ausência de BChE completamente (JOHNSON; MOORE, 2012).

As variantes responsáveis por reduzir a atividade a valores menores que 10% quando comparada à média da atividade da enzima usual são denominadas silenciosas e algumas são caracterizadas como quantitativas, uma vez que alterações na produção, na estabilidade e na meia-vida das moléculas resulta em uma redução no número de moléculas circulantes eficazes (BARTELS *et al.*, 1992). Um grande número de alelos correspondentes a essas variantes silenciosas já foi identificado, os quais podem ocasionar alterações na matriz de leitura, substituição de aminoácidos e formação de códons de terminação prematura. Em revisão de Whittaker (1986), a estimativa da frequência global dessas variantes, isto é, sem considerar a heterogeneidade genética, está em torno de 0,3%. Essas variantes, bem como as mutações já descritas na literatura, estão indicadas na TABELA 1.

A variante atípica A (rs1799807) é causada por uma substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 209 no exon 2 resultando numa substituição de ácido aspártico por glicina (D70G) (MCGUIRE *et al.*, 1989). Sabendo que o resíduo Asp70 é um local de ligação de substrato no sítio aniônico periférico da BChE, sua substituição leva a uma diminuição da afinidade por ésteres de colina, resultando em uma redução de 30% da atividade da enzima quando comparada com a enzima usual (MASSON *et al.*, 2001), o que pode explicar a resposta prolongada de relaxamento muscular após administração endovenosa de succinilcolina.

A enzima variante K (rs1803274) localizada no exon 4 é causada por uma substituição de guanina por adenina no nt 1615 resultando em uma substituição de alanina por treonina (A539T) (BARTELS *et al.*, 1992). Possui uma concentração plasmática 33% menor em relação à forma usual da BChE e Podoly *et al.* (2009) sugerem que uma mudança estrutural determinada pela presença da variante K na região C-terminal da enzima, importante para a tetramerização, leva a uma redução na sua atividade hidrolítica devido a uma instabilidade causada pela substituição de A539T (RUBINSTEIN, 1978).

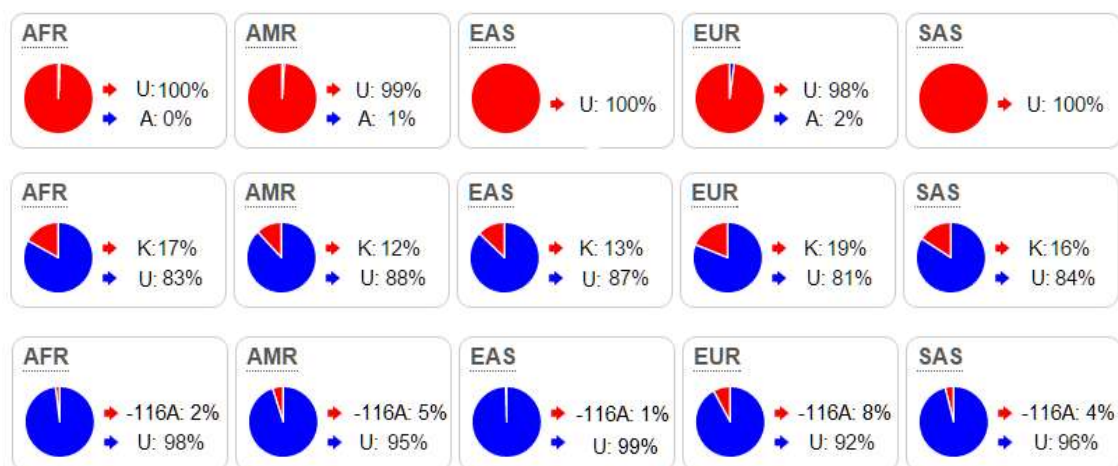
As variantes A e K estão em desequilíbrio de ligação, o que indica uma associação não aleatória destes alelos nos diferentes sítios. A mutação K foi encontrada em cerca de 90% dos indivíduos que também continham a mutação A. A presença conjunta dessas mutações não altera qualitativamente a enzima variante atípica, mas parece levar a uma redução de um terço da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da atividade desta enzima (BARTELS *et al.*, 1992).

O exon 1 do gene *BCHE* contém um sítio polimórfico no nucleotídeo -116 (rs1126680), conhecido como variante -116A (BARTELS; SPEK; DU, 1990). Apesar desta variante estar situada em uma região não-codificadora da proteína, ela está localizada em uma região transcrita, o que pode afetar a transcrição ou até a tradução da proteína (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008).

O estudo de Furtado-Alle *et al.* (2008) identificou que a atividade reduzida da BChE, antes atribuída a presença da variante K, deve-se a presença conjunta da K com a -116A, pois a presença apenas do alelo K não alterou significativamente a atividade da BChE. Os autores sugerem que a presença da variante -116A interfira na ligação de elementos reguladores no processo de transcrição ou tradução do gene *BCHE*, pois essa variante encontra-se na região 5' UTR do mRNA.

As frequências dos alelos mutados das variantes A (209), K (1615) e -116A em populações da África, América, Leste Asiático, Europa e Sul da Ásia podem ser vistas na FIGURA 5.

FIGURA 5. FREQUÊNCIAS DOS ALELOS DAS VARIANTES A, K E -116 ENTRE AS DIFERENTES ETNIAS



FONTE: Adaptado de HapMap, acessado em 08/10/2017.

LEGENDA: (AFR) África, (AMR) América, (EAS) Leste Asiático, (EUR) Europa e (SAS) Sul da Ásia. U: alelo usual (não mutado), A: alelo mutado da variante A, K: alelo mutado da variante K, -116A: alelo mutado da variante -116A.

Uma frequência muito baixa do alelo atípico (A) é observada em todo o mundo, mas em especial nas populações asiática e africana. Na Europa, encontra-se a maior frequência do alelo A, sendo ainda mais frequente entre franceses e espanhóis (WHITTAKER, 1986).

A população brasileira é geneticamente muito diversa resultante da contribuição de três grandes grupos: caucasoides, africanos e ameríndios. Devido ao grande tamanho territorial do Brasil e a diversidade da sua colonização, diferentes regiões do país apresentam predominância maior ou menor de cada um dos grupos étnicos descritos (MACIEL, 2007).

Os habitantes do sul e sudeste do país possuem origem étnica como resultado do longo período de colonização e imigração por parte de grupos europeus. Assim, sua composição genética está intimamente relacionada às variantes alélicas presentes nessa população.

As frequências dos alelos A, K e -116A foram estimadas em 1,8%, 18% e 8%, respectivamente, para a população euro-brasileira (SOUZA *et al.*, 1998; MIKAMI, 2005, FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). Esses valores se assemelham muito àqueles estimados para a população europeia, conforme a FIGURA 5.

3. METODOLOGIA

Esse estudo provém de um convênio institucional entre o Departamento de Genética da UFPR (Laboratório de Polimorfismo e Ligação) e o Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de Santa Catarina, que abriga o Laboratório de Pesquisa de Pseudocolinesterase atípica (Labcol).

3.1 PARTICIPANTES

O trabalho contempla a análise diagnóstica de 20 indivíduos que foram submetidos a algum procedimento cirúrgico e apresentaram um quadro de apneia prolongada em resposta ao relaxante muscular administrado. Esses indivíduos são de diferentes estados do Sul e Sudeste do Brasil (PR, RJ, RS, SC, SP) e possuem idade entre 15 e 81 anos, sendo 11 mulheres e 9 homens.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído pela técnica de *salting out*, de acordo com o método de Lahiri e Nurnberger (1991), com algumas modificações.

Foram coletados 6 ml de sangue em EDTA, que foram armazenados na geladeira por no máximo uma semana. Esse sangue foi transferido para um *falcon* de 15 ml, onde foram adicionados 125 µl de IGEPAL CA-630 (detergente solubilizador de membrana). O volume foi preenchido até completar 10 ml com TKM1 (tampão formado por Tris-HCL-pH 7,6 a 1M, KCL a 1M, MgCl₂ a 1M, EDTA-pH 7,6 a 0,1M e água destilada). Misturou-se manualmente. O material foi centrifugado por 20 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi desprezado. Completou-se novamente o volume até 10 ml com TKM1 e ressuspendeu-se o precipitado com pipeta Pasteur, até que se tornasse homogêneo. Em seguida, foi realizada outra centrifugação. Os últimos dois passos foram repetidos até que o precipitado estivesse limpo, isto é, com coloração clara.

Foram adicionados 800 µl de TKM2 (mesmo que TKM1 porém com adição de NaCl a 1M), o precipitado foi ressuspendido com uma pipeta e o volume, transferido para um

microtubo de 1,5 ml. Em seguida, foram acrescentados 50 µl de SDS, dodecil sulfato de sódio, 10% (detergente iônico, cuja função é romper as membranas celulares) misturando a amostra de forma a distribuir por todo o tubo. O material foi incubado em banho-maria a 55°C por um intervalo de tempo entre 2 horas e 24h.

Os microtubos foram retirados do banho-maria. Foram adicionados 300 µl de solução saturada de NaCl 5M misturando bem a amostra para que ocorresse a precipitação das proteínas. O material foi centrifugado a 1200 rpm por 20 minutos. O sobrenadante contém o DNA e o precipitado, as proteínas. Transferiu-se 550 µl do sobrenadante para um tubo de 2 ml, onde foram colocados 1100 µl (2 vezes o volume inicial) de etanol absoluto gelado, para que ocorresse a renaturação do DNA. Em seguida, o tubo foi tampado e invertido cuidadosamente de tampa para baixo, em movimentos repetidos, até o aparecimento da “nuvem” de DNA.

A amostra foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão, prestando atenção para o “pellet” de DNA não se soltar. Na sequência, o DNA foi lavado através da adição de 500 µl de etanol 70%. Essas três etapas foram repetidas duas vezes. Na última vez, retirou-se o sobrenadante delicadamente com pipeta, preservando o “pellet”.

O microtubo foi então colocado em estufa a 37°C para evaporação do álcool restante. Quando o tubo estava totalmente seco, sem nenhuma gotícula de álcool, o DNA foi ressuspensionado com 200 µl de TE (conservante de DNA). Os microtubos foram deixados em banho-maria a 55°C por 45 minutos, obtendo-se uma solução mais viscosa.

3.3 QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA

A concentração do DNA foi determinada através do equipamento-*Nanodrop*®. De acordo com essa concentração, foi feita a diluição das amostras com água Mili-Q para que fosse atingida a concentração desejada de DNA, 20 ng/µl para realização da discriminação alélica por Taqman.

3.4 DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA

A discriminação alélica foi realizada por *Taqman SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems*) para as variantes A, K e -116A. O aparelho utilizado foi o *Applied Biosystems Viia*

7 *Real-Time PCR System*, sendo realizadas as seguintes etapas: 1) 50°C por 2 minutos, 2) 95°C por 10 minutos, 3) 50 ciclos de 1 minuto e 15 segundos cada, sendo 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 62°C, 4) 60°C por 2 minutos.

Primeiramente, aumentou-se a temperatura para que houvesse desnaturação do DNA. Em seguida, a temperatura foi reduzida para que ocorresse anelamento dos *primers* em posições específicas (a temperatura é definida de acordo com a sequência de nucleotídeos dos *primers*). Por fim, a temperatura foi novamente aumentada para que a DNA polimerase fizesse a duplicação da cadeia a partir dos *primers* (extensão). Esse ciclo foi repetido 50 vezes, gerando uma amplificação específica do DNA.

Na sequência de DNA ligou-se uma sonda, que apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que inibe a fluorescência do fluoróforo enquanto ligado). Devido a atividade exonucleásica 5'→3' da *Taq*DNA polimerase, a sonda foi clivada ocasionando a liberação do fluoróforo e o aumento da intensidade da fluorescência, uma vez que se desligou do *quencher*. Conforme os ciclos foram ocorrendo, a fluorescência foi aumentando de acordo com a quantidade de DNA amplificado. Quando somente uma das fluorescências estava presente, a amostra era considerada homozigota para aquele alelo; se as duas fluorescências fossem encontradas, a amostra era considerada heterozigota (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; LIMA, 2013).

3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática da BChE no plasma sanguíneo foi obtida segundo a metodologia de Dietz *et al.* (1972), modificada por Evans e Wroe (1978). Essa metodologia se baseia na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2- nitrobenzoato, substância de coloração amarela.

Para a mensuração da atividade foram diluídas todas as amostras. Foram utilizados microtubos de 1 mL onde o plasma sanguíneo foi misturado à água destilada na proporção de 1:100 (5 µL de plasma em 500 µL de água). Foi utilizado um controle de atividade enzimática já conhecida para avaliar a qualidade da placa. Na placa de leitura, adicionou-se 220 µL do tampão fosfato com DTNB e acrescentou-se 25 µL da amostra diluída. É imprescindível que o

substrato seja adicionado em cada amostra imediatamente antes de ser realizada a leitura, pois possui reação rápida. Foram utilizados 5 μ L de propioniltiocolina em cada poço.

A leitura foi feita no espectrofotômetro com leitor de microplaca, a temperatura de 25°C e 410 nm de absorbância.

3.6 ANÁLISE DE DADOS

Foi realizada uma análise descritiva das informações obtidas de todos os pacientes. Para parâmetros como idade, peso e altura foi realizada uma média aritmética. Dados como genótipo e atividade enzimática, adquiridos no diagnóstico molecular do presente estudo, foram apresentados através da estimativa de frequência. Foi realizada uma análise comparativa da relação entre o genótipo de cada indivíduo para cada variante e sua respectiva atividade enzimática. Foi preparado um laudo descritivo com o genótipo para a variante A e a atividade enzimática de cada paciente, conforme modelo em APÊNDICE.

4. RESULTADOS

Foi realizada uma análise descritiva dos dados de alguns participantes, devido à dificuldade de obtenção das informações, levando em consideração algumas variáveis. Na TABELA 2 estão representadas as variáveis com suas respectivas médias e erro padrão da média.

TABELA 2 - N, MÉDIA \pm ERRO PADRÃO DA MÉDIA DE TODOS OS PARTICIPANTES PARA AS VARIÁVEIS ANALISADAS.

Variáveis	N	Média \pm Erro padrão da média
Idade	15	44 \pm 1,29
Peso (Kg)	14	69,64 \pm 0,79
Altura (m)	14	1,64 \pm 0,01

NOTA: O número amostral (N) varia devido à falta de dados de alguns indivíduos.

Foram calculadas as frequências genotípicas das variantes A (rs1799807), K (rs1803274) e -116A (rs1126680), isoladamente, na amostra total, conforme mostram os gráficos 1, 2 e 3. E a frequência do genótipo homozigoto usual (U/U) para todas as variantes, conforme o gráfico 4.

GRÁFICO 1. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DA VARIANTE A ENTRE OS PARTICIPANTES

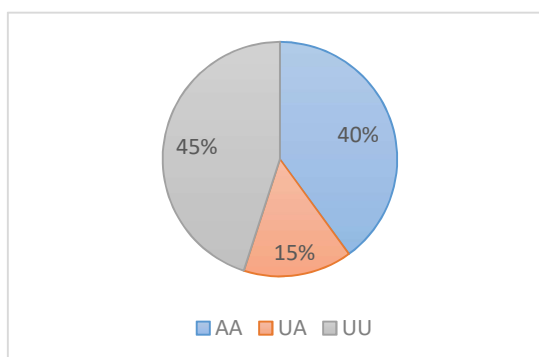


GRÁFICO 2. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DA VARIANTE -116A ENTRE OS PARTICIPANTES

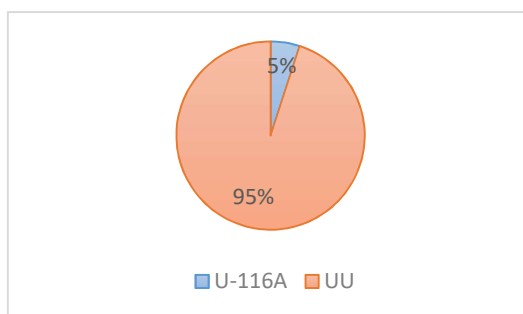


GRÁFICO 3. FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DA VARIANTE K ENTRE OS PARTICIPANTES

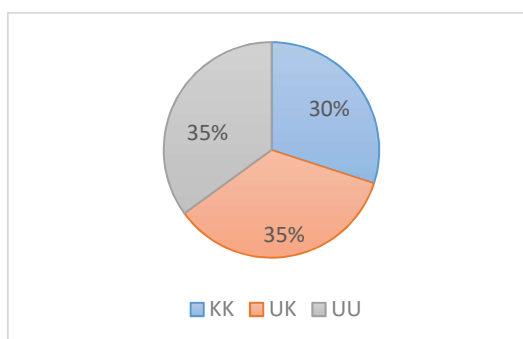
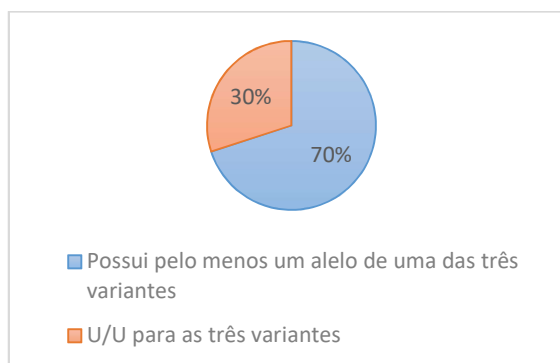


GRÁFICO 4. FREQUÊNCIA DO GENÓTIPO U/U DENTRE OS PARTICIPANTES



Os GRÁFICOS 1, 2 e 3 mostram que 55% dos participantes são portadores da variante A, 65% são portadores da variante K e 5% são portadores da variante -116A. A partir do GRÁFICO 4 é possível inferir que dos 20 indivíduos participantes, 70% (14 indivíduos) é portador de pelo menos uma das variantes e 30% (6 indivíduos) não apresentam nenhuma delas.

A análise do GRÁFICO 3 e da TABELA 3 mostra que dos 65% dos indivíduos (13 de 20) que apresenta o alelo mutado K, seja em homozigose ou heterozigose, 15,38% (2

indivíduos) apresenta somente a variante K e uma atividade enzimática da BChE baixa, sugerindo que a presença da mutação pode ser a causa da apneia prolongada vivenciada; 76,92% (10 indivíduos) possui também a variante A e os 7,7% (1 indivíduo) restante apresenta a variante -116A.

TABELA 3. LISTA DOS INDIVÍDUOS PARTICIPANTES COM SEUS RESPECTIVOS GENÓTIPOS PARA AS VARIANTES A, K E -116A E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE

Indivíduo	Genótipo para a variante A	Genótipo para a variante K	Genótipo para a variante -116A	Atividade enzimática da BChE
1	A/A	K/K	U/U	0,987
2	U/U	U/U	U/U	0,979
3	U/U	U/U	U/U	1,076
4	U/A	U/K	U/U	0,990
5	U/U	U/K	U/-116A	1,018
6	U/U	U/U	U/U	0,928
7	U/A	U/U	U/U	1,003
8	A/A	U/K	U/U	-
9	A/A	U/K	U/U	1,029
10	U/U	K/K	U/U	-
11	U/U	U/K	U/U	0,995
12	A/A	U/K	U/U	0,880
13	A/A	K/K	U/U	0,976
14	U/U	U/U	U/U	0,942
15	U/A	U/K	U/U	0,908
16	A/A	K/K	U/U	-
17	U/U	U/U	U/U	-
18	A/A	K/K	U/U	0,984
19	A/A	K/K	U/U	0,911
20	U/U	U/U	U/U	-

NOTA: A falta de informação é devido a falhas na hora da coleta do sangue, resultando em plasma hemolisado, o que altera os resultados.

Foi medida a atividade enzimática da BChE no plasma sanguíneo dos indivíduos que não apresentaram amostra hemolisada. Os resultados obtidos estão representados na TABELA 3. Segundo Ellman et al. (1961), o valor de referência para a colinesterase plasmática é 1,5 – 3,5 UI/mL. Assim, é possível observar que todos os indivíduos apresentam baixa atividade da BChE, como esperado, já que todos os pacientes apresentaram episódio de apneia prolongada após o uso de succinilcolina. Foi realizada também uma comparação entre a atividade enzimática da BChE e os genótipos de cada indivíduo para cada variante, conforme mostra a TABELA 3.

5. DISCUSSÃO

O estudo avaliou as variantes genéticas do gene *BCHE* que podem estar associadas a episódios de apneia prolongada após o uso de succinilcolina em uma amostra de pacientes que passaram por esta situação. Importantes resultados quanto a presença de algumas variantes e a sua relação com a atividade enzimática da BChE foram observados. O esperado era que a maior parte dos indivíduos apresentasse pelo menos um alelo da variante A e possuisse atividade enzimática da BChE baixa, visto que esta mutação é conhecida por diminuir a afinidade da enzima por ésteres de colina. Isso prejudica a metabolização de fármacos que contenham ésteres de colina, o que leva ao risco de apneia prolongada (MASSON *et al.*, 2001). Entretanto, foi observado que quase metade dos indivíduos é homozigoto usual para a variante A. Assim, foi necessário a busca por outras variantes que também tem influência sob a enzima.

Rubinstein *et al.* (1978) mostraram que pessoas que possuem a variante K apresentam uma concentração plasmática da BChE 33% menor que indivíduos usuais para a variante, o que poderia explicar o tempo mais prolongado necessário para metabolizar bloqueadores neuromusculares, como a succinilcolina. Os resultados encontrados mostram que 13 dos 14 indivíduos que apresentam alguma variante são portadores da variante K. Além disso, 76,92% dos indivíduos portadores da variante K também apresentam a variante A, o que está em conformidade com o estudo de Bartels (1992) que mostra que as duas variantes estão em desequilíbrio de ligação. Além disso, esses indivíduos apresentam baixa atividade enzimática podendo explicar a situação de apneia.

Os 7,7% (1 indivíduo) restante apresentam a variante -116A. Embora a regulação da expressão do gene *BCHE* não seja bem conhecida, Furtado-Alle *et al.* (2008) sugerem que a variante -116A pode interferir na ligação de elementos reguladores durante a transcrição ou tradução do gene *BCHE*, pois essa variante encontra-se na região 5' UTR do mRNA. Isso pode alterar a expressão da BChE, o que pode influenciar na metabolização dos bloqueadores neuromusculares. A presença concomitante das duas variantes já foi descrita como uma associação não aleatória em um estudo realizado por Bartels (1990).

Os indivíduos 2, 3, 6, 14, 17 e 20 indicados na TABELA 3, representam os 30% mostrados no GRÁFICO 4 que não apresentaram nenhum alelo das três variantes citadas. Isso nos leva a sugerir que eles podem apresentar alguma variante silenciosa presente no exon 2,

região codificante de 83% da proteína, que pode afetar a atividade da enzima e, consequentemente, a metabolização da succinilcolina.

A atividade enzimática dos indivíduos foi mensurada com o objetivo de demonstrar, com sucesso, que a atividade da BChE se apresenta muito baixa, menor ou igual a 1U/mL. É possível observar que todos os indivíduos, independente do genótipo para cada variante, apresentaram esse resultado, o que sugere uma justificativa para o episódio de apneia prolongada vivenciado.

Além das variantes do gene *BCHE*, que são os principais fatores genéticos envolvidos na diminuição da atividade da enzima BChE, há vários fatores ambientais e fisiológicos associados com alterações na sua atividade, como por exemplo, estrógenos, hepatite, doenças renais, anemias, infecções (WHITTAKER, 1980), os quais não foram considerados. Assim, os indivíduos que não apresentaram nenhuma variante podem ter sofrido influência de algum destes fatores, resultando nos episódios de apneia prolongada.

Sabendo que a saúde do Homem não é perfeita e carece de cuidados ao longo da vida e que enfermidades e situações imprevistas podem acontecer, ninguém está isento de em algum momento da vida necessitar de um procedimento cirúrgico. Ademais, mutações genéticas no gene *BCHE* acontecem aleatoriamente. Não há distinção de gênero, idade, altura ou peso para essas situações. Sendo assim, a TABELA 2 apenas descreve que não há influência de variáveis como peso, altura e idade para que ocorram os efeitos de relaxamento muscular prolongado após o uso de succinilcolina.

Considerando todos esses dados, o baixo custo e a facilidade da metodologia, é possível observar a importância da realização do teste de atividade enzimática da BChE no pré-operatório, como uma maneira de evitar efeitos indesejados durante a cirurgia, bem como qualquer estresse para o paciente e seus familiares, preservando-os de maiores preocupações.

REFERÊNCIAS

- ALLDERDICE, P. W. *et al.* The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, v. 11, n. 2, p. 452–454, 1991.
- ARPAGAUS, M.; KOTT, K.P.; VATSIS, C.F.; BARTELS, B.N.; LA DU, O.; LOCKRIDGE. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v 29, n 124 -131, 1990.
- BARAKA, A. Succinylcholine "the gold standard" for rapid-sequence induction of anesthesia. **Middle East J Anesthesiol**, v. 21, p. 323-324, 2011.
- BARTELS, C. F. *et al.* DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **American journal of human genetics**, v. 50, n. 5, p. 1086–1093, 1992.
- BARTELS, C. F.; SPEK, A. F. L. VAN DER; DU, B. N. LA. Two polymorphisms in the non-coding regions of the BCHE gene. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6171, 1990.
- BLONG, R. M.; BEDOWS, E.; LOCKRIDGE, O. Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. **The Biochemical journal**, v. 327 (Pt 3, p. 747–757, 1997.
- CHAVES, T. J. *et al.* -116A and K BCHE gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 1, p. 341–343, 2013.
- DARVESH, S.; HOPKINS, A. D.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 4, p. 131-138, 2003.
- DAVIS, L.; BRITTEN, JJ.; MORGAN, M. Cholinesterase. Its significance in anaesthetic practice. **Anaesthesia**, v 52, n 244–260, 1997.
- DELACOUR, H. *et al.* Characterization of a novel butyrylcholinesterase point mutation (p . Ala34Val), ““ silent ”” with mivacurium. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 3, p. 476–483, 2014.
- DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e HODGES, L.K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Genet.**, v. 24, p.58-64, 1972.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- EVANS, R.T. e WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 1762-1766, 1978.
- FURTADO-ALLE, L. *et al.* Chemico-Biological Interactions Association of variants of the – 116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. v. 175, p. 115–118, 2008.
- GÄTKE, M.R.; OSTERGAARD, D.; BUNDGAARD, J.R.; VARIN, F.; VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for a novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiology**, v.95, n.3, p.600-6. Sep, 2001.

GÄTKE, M. R. *et al.* Response to Mivacurium in Patients Carrying the K Variant in the Butyrylcholinesterase Gene. n. 3, p. 503–508, 2005.

GÄTKE, M. R. *et al.* Response to Mivacurium in Patients Carrying the K Variant in the Butyrylcholinesterase Gene. n. 3, p. 503–508, 2017.

GIACOBINI, E. Cholinesterases and cholinesterases inhibitors. **Giacobini, E. (ed)**, p. 181-226, 2000.

GOLDBERG, M. E.; LARIJANI, G. E.; AZAD, S. S.; SOSIS M.; SELTZER, J. L.; ASCHER, J.; WEAKLY, J. N. Comparison of tracheal intubating conditions and neuromuscular blocking profiles after intubating doses of mivacurium chloride or succinylcholine in surgical outpatients. **Anesth. Analg.**, v. 69, p. 93-99, 1989.

GUTTMACHER, A. E.; COLLINS, F. S.; WEINSHILBOUM, R. Inheritance and Drug Response. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 529–537, 2003.

HAPMAP. Disponível em:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=3:165830241-165831241;v=rs1799807;vdb=variation;vf=1243957. Acessado em 08/10/2017.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 781–90, 2000.

JOHNSON, G.; MOORE, S. W. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 5, p. 783–797, 2012.

KALOW, W., STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. **Can. J. Med. Sci.**, v. 35, p. 1305–1320, 1957.

KALOW, W., GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase: Determination of dibucaine numbers. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 339–46, 1957.

KALOW, W. Pharmacogenetics: Heredity and the Response to Drugs. **Philadelphia: W. B. Saunders Co.**, p. 69–136, 1962.

KAUFMAN, S. E. *et al.* Prolonged neuromuscular paralysis following rapid-sequence intubation with succinylcholine. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 45, n. 4, 2011.

LAHIRI, D. K. e NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p. 5444, 1991.

LI, B.; DUYSSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1–3, p. 88–91, 2008.

LIMA, J. K. **Estudo de associação entre butirilcolinesterase e síndrome metabólica**. 57f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H. W.; LA DU, B. N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. **The Journal of biological chemistry**, v. 254, n. 17, p. 8324–30, 1979.

LOCKRIDGE, O. *et al.* Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 2, p. 549–57, 1987.

LOCKRIDGE, O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 35–60, 1990.

LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 148, p. 34–46, 2015.

M.E., G. *et al.* Comparison of tracheal intubating conditions and neuromuscular blocking profiles after intubating doses of mivacurium chloride or succinylcholine in surgical outpatients. **Anesthesia and Analgesia**, v. 69, n. 1, p. 93–99, 1989.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim Bioph Acta**, v.988, p.258-266, 1989.

MASSON, P. *et al.* Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the ?? loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1544, n. 1–2, p. 166–176, 2001.

MASSOULIÉ, J. The Origin of the Molecular Diversity Cholinesterases. **Neurosignals**, p. 130–143, 2002.

MCGUIRE, M. C. *et al.* Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 3, p. 953–957, 1989.

METZGER, I. F. FARMACOGENÉTICA: PRINCÍPIOS , APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS *. v. 39, n. 4, p. 515–521, 2006.

MESULAM, M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A.,DUYSEN, E. G., LOCKRIDGE, O. Preservation of cholinergic system in AChE knockouts and the role of BChE in acetylcholine hydrolysis. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 27, p. 2565, 2001.

MIKAMI, L.R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com atividade da butirilcolinesterase**. Curitiba, 2005. 180f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_009031.1?from=5001&to=69562&report=genbank . Acessado em 10/04/2017.

ØSTERGAARD, D. *et al.* Half-life of plasma cholinesterase. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 32, n. 3, p. 266–269, 1988.

PARNAS, M. L. *et al.* Concordance of Butyrylcholinesterase Phenotype With Genotype. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 135, n. 2, p. 271-276, 2011.

PODOLY, E., *et al.* The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. **J. Biol. Chem.** 284 (25), 17170–17179, 2009.

RUBINSTEIN, H. M.; DIETZ, A. A.; LUBRANO, T. Cholinesterase Locus 1. p. 27–29, 1978.

SHAFFERMAN, A. *et al.* Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 25, p. 17640–17648, 1992.

SHASTRY, B. S. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 6, n. 1, p. 16–21, 2006.

SHI, M. M.; BLEAVINS, M. R.; LA IGLESIA, F. A. Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 4 II, p. 591–595, 2001.

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA L.; FREUND, A.A.; CULPI L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase *K* mutation in the Brazilian population of European and African origin. **Hum. Biol.** v. 70, p. 965-70, 1998.

SOUZA, R. L. R. *et al.* Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 84, n. 4, p. 349–353, 2005.

SUN, H. Cocaine Metabolism Accelerated by a Re-Engineered Human Butyrylcholinesterase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 2, p. 710–716, 2002.

THORISSON, G. A.; STEIN, L. D. The SNP consortium website: Past, present and future. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 124–127, 2003.

VIJAYARAGHAVAN, S. *et al.* Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity-The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

WEINSHILBOUM, R.; WANG, L. Pharmacogenomics: bench to bedside. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 739–748, 2004.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anaesthesia**, v. 35, n. 2, p. 174–197, 1980.

WHITTAKER, M. Cholinesterase monographs in humans, genetics. Backman Karger L, editor. **Switzerland: R.L. Basel**, vol. 11, p. 1–90, 1986.

APÊNDICE

ANÁLISE GENÉTICA DA BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)

Pacientes portadores de variantes genéticas da BChE são incapazes de hidrolisar e metabolizar normalmente a succinilcolina, podendo sofrer apneia prolongada quando submetidos a doses padrões dessa droga.

A variabilidade genética da BChE é determinada pelo loco *BCHE* que apresenta os alelos: BCHE*U (usual), o qual determina a forma mais frequente da BChE, capaz de metabolizar a droga e BCHE*A (atípico) que condiciona a enzima atípica, a qual apresenta afinidade reduzida pela droga e pode ocasionar os efeitos prolongados.

O diagnóstico implica na determinação da atividade da butirilcolinesterase, que se encontrará diminuída se o paciente apresentar a forma atípica, e da identificação genética da variação do gene.

Paciente:

Atividade enzimática da BChE:

Genótipo:

O paciente é homozigoto ou heterozigoto, ou seja, possui 2 alelos atípicos ou usuais, ou um usual e um atípico, e apresenta atividade enzimática da BChE reduzida, o que pode explicar os efeitos observados após utilização de succinilcolina.

ANA PAULA ROUTH PEIXOTO

Acadêmica de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná